ISSN 1188-4169

Canada Communicable Disease Report

Relevé des maladies transmissibles au Canada

Date of Publication: 15 December 1999 **Vol. 25-24** Date de publication : 15 décembre 1999

Contained in this issue:

Measles Surveillance: Guidelines for Laboratory Support 201

Contenu du présent numéro :

Surveillance de la rougeole : lignes directrices pour le soutien des laboratoires 201

MEASLES SURVEILLANCE: GUIDELINES FOR LABORATORY SUPPORT

Introduction

Following the commitment by all provinces and territories to eliminate measles by the year 2005, a two-dose measles vaccine schedule has been adopted across the country, augmented by mass vaccination "catch-up" programs in almost all jurisdictions. As the number of cases of measles declines, the importance of surveillance will become even greater than at present. It will be more and more crucial that all suspected cases of measles be reported and samples from all sporadic cases be submitted for full laboratory investigation.

To oversee and document the process of measles elimination, the Laboratory Centre for Disease Control (LCDC) convened the Working Group on Measles Elimination in Canada (WGMEC) in 1995. This group reviews measles elimination efforts across the country, monitors case incidence, and makes recommendations about national surveillance.

The importance of a standard set of laboratory procedures to be used across the country is evident in any assessment of measles surveillance procedures. A subgroup of WGMEC*, with additional laboratory support, has therefore developed these guidelines to ensure optimum laboratory surveillance of measles at a time when, with fewer cases, false positive serological results will be more likely, and it will become increasingly important to detect any importation of virus into a community.

Effective laboratory support for surveillance requires that

- health-care professionals be aware of the system and its requirements,
- appropriate specimens are collected and sent to a laboratory capable of performing the necessary tests,
- reliable equipment is used and tests performed correctly,

* The members of the Working Group on Measles Elimination in Canada laboratory issues subgroup are: Dr. M. Fearon (Ontario Ministry of Health), Dr. B. Ward (McGill University), Dr. S. Ratnam (Newfoundland Public Health Laboratory), Dr. G. Tipples (LCDC), M. Fauvel (Laboratoire de santé publique du Québec), Dr. J. Waters (Alberta Health), and M. Litt (LCDC).

SURVEILLANCE DE LA ROUGEOLE : LIGNES DIRECTRICES POUR LE SOUTIEN DES LABORATOIRES

Introduction

Pour donner suite à l'engagement de toutes les provinces et territoires à éliminer la rougeole d'ici l'an 2005, un schéma d'immunisation prévoyant deux doses de vaccin antirougeoleux a été adopté dans l'ensemble du pays, complété par des programmes de vaccination de «rattrapage» de masse dans pratiquement toutes les provinces. À mesure que le nombre de cas de rougeole diminuera, la surveillance deviendra encore plus importante qu'elle l'est actuellement. Il sera essentiel que tous les cas de rougeole suspects soient déclarés et que des échantillons prélevés chez des cas sporadiques soient soumis au laboratoire pour investigation complète.

Pour encadrer et documenter le processus d'éradication de la rougeole, le Laboratoire de lutte contre la maladie (LLCM) a réuni le Groupe de travail sur l'éradication de la rougeole au Canada (GTERC) en 1995. Ce groupe examine les efforts d'éradication de la rougeole dans l'ensemble du pays, surveille l'incidence des cas et présente des recommandations concernant la surveillance nationale.

L'importance d'utiliser un ensemble uniforme de procédures de laboratoire dans tout le pays est évident pour bien évaluer les méthodes de surveillance de la rougeole. Un sous-groupe du GTERC*, bénéficiant d'un soutien additionnel des laboratoires, a donc élaboré ces lignes directrices pour garantir une surveillance de laboratoire optimale de la rougeole à un moment où, avec un nombre restreint de cas, on observera vraisemblablement plus de résultats sérologiques faussement positifs et il deviendra de plus en plus important de détecter toute importation du virus dans une collectivité.

Un soutien de laboratoire efficace pour la surveillance nécessite que

- les professionnels de la santé connaissent le système et ses exigences;
- des prélèvements appropriés soient recueillis et envoyés à un laboratoire capable de réaliser les tests nécessaires;
- du matériel fiable soit utilisé et que les tests soient effectués correctement;

* Les membres du Sous-groupe de questions touchant les laboratoires du Groupe de travail sur l'éradication de la rougeole au Canada sont : Dr M. Fearon (Ministère de la Santé de l'Ontario), Dr B. Ward (Université McGill), Dr S. Ratman (Newfoundland Public Health Laboratory), Dr G. Tipples (LLCM), M. Fauvel (Laboratoire de santé publique du Québec), Dr J. Waters (Alberta Health) et M. Litt (LLCM).

- feedback is provided to the appropriate authorities and in a timely fashion, and
- the integrity of the surveillance system is monitored on an ongoing basis.

Both the public-health authority and the laboratory have a role in ensuring optimum laboratory surveillance of measles in a jurisdiction. These guidelines have been structured to reflect these roles. The role of public-health professionals is to educate health-care providers on the importance of laboratory testing and to make sure that the laboratory resources are accessible. The role of laboratories is to develop and maintain testing resources, standard procedures, and quality assurance; and to analyze data and provide feedback of the results to public-health authorities.

The following guidelines, which have been updated in a number of key areas to reflect the progress of measles elimination in Canada, propose a standard set of responsibilities for adoption in each province or territory to facilitate effective laboratory support for the surveillance of measles.

Laboratory Issues

Laboratory Methods for Diagnosing Measles

- Laboratory diagnosis of measles is done by serologic testing and/or culture.
- Measles specific IgM serology is the standard test of choice for routine diagnosis of measles.
- Demonstration of a significant increase* in measles specific IgG titre is a reliable alternative serologic method for diagnosis.

Measles virus isolates are important for surveillance purposes (molecular epidemiology) as well as for confirmatory purposes; therefore, collection of appropriate specimens for culture is recommended for all sporadic cases and a sample of cases in an outbreak.

Appendix A contains the measles case definitions and appendix B outlines the decision-making process for measles case investigation.

All clinical and suspected cases of measles should be confirmed by a laboratory. If an epidemiologic link to an already confirmed case has been established, laboratory confirmation is not necessary for the case to meet the "confirmed" case definition. To detect cases of measles and to avoid misdiagnosis of rash illness, it is important to use a laboratory testing protocol to screen for common red rash illnesses.

Upon suspicion of measles, clinicians should immediately collect specimens for serology and virus isolation for the purpose of laboratory confirmation.

* A four-fold rise in IgG titre using such assays as complement fixation (CF) or hemagglutination (HI) has traditionally been used to define significant increases in antibody titres. These tests have mostly been replaced by enzyme immunoassays (EIAs), which may or may not permit quantitative measurement. Many commercial IgG EIAs, such as the Behring Enzygnost test, use a slightly modified procedure to demonstrate a significant rise in antibody titre betwen acute and convalescent serum specimens. Alternatively, paired specimens can be referred to a reference center for CF, HI, or plaque reduction neutralization testing.

- la rétroaction soit dirigée vers les autorités compétentes dans les plus brefs délais; et
- l'intégrité du système de surveillance soit constamment contrôlée.

Le service de santé publique et le laboratoire ont tous deux un rôle à jouer dans l'optimisation de la capacité du laboratoire de soutenir la surveillance de la rougeole dans une province ou un territoire. Ces lignes directrices ont été structurées pour refléter ces rôles. Le rôle des professionnels de la santé publique consiste à sensibiliser les pourvoyeurs de soins de santé à l'importance des tests en laboratoire et à veiller à ce que les ressources du laboratoire soient accessibles. Le rôle des laboratoires consiste à développer et à maintenir les ressources nécessaires pour effectuer les tests, des procédures uniformes et l'assurance de la qualité et à analyser les données et rendre compte des résultats aux services de santé publique.

Les lignes directrices suivantes, qui ont été mises à jour de manière à tenir compte des progrès réalisés dans l'élimination de la rougeole au Canada, proposent un ensemble uniforme de responsabilités devant être adoptées dans chaque province ou territoire afin de permettre aux laboratoires de soutenir efficacement la surveillance de la rougeole.

Questions relatives aux laboratoires

Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la rougeole

- Le diagnostic de la rougeole en laboratoire est effectué au moyen de tests sérologiques et/ou de cultures.
- La sérologie IgM spécifique de la rougeole est le test standard pour le diagnostic courant de la rougeole.
- La démonstration d'une augmentation significative* des IgG spécifiques est une méthode alternative fiable pour le diagnostic sérologique de la rougeole.

Les isolats de virus de la rougeole sont importants pour la surveillance (épidémiologie moléculaire) ainsi qu'à des fins de confirmation. C'est pourquoi la collecte des prélèvements appropriés pour la culture est recommandée pour tous les cas sporadiques et pour un échantillonnage lors d'une éclosion.

L'annexe A présente les définitions de cas de la rougeole et l'annexe B donne un aperçu du processus de prise de décision pour l'investigation des cas de rougeole.

Tous les cas cliniques et soupçonnés de rougeole devraient être confirmés par un laboratoire. Si un lien épidémiologique avec un cas confirmé par un laboratoire a été établi, une confirmation de laboratoire n'est pas nécessaire pour que le cas réponde à la définition de «confirmé». Il est important d'utiliser un algorithme de laboratoire approprié pour détecter systématiquement les maladies érythémateuses afin de pouvoir identifier les cas de rougeole et d'éviter un diagnostic erroné de l'éruption.

Lorsqu'ils soupçonnent qu'ils sont en présence d'un cas de rougeole, les cliniciens devraient prélever immédiatement des échantillons pour le test sérologique et l'isolement du virus afin de faire confirmer leurs soupçons par un laboratoire.

* Une augmentation significative (x4) du titre des IgG a par le passé été définie par des techniques telles que la fixation du complément ou l'inhibition de l'hémagglutination. Ces tests ont principalement été remplacés par les essais immunoenzymatiques qui quelquefois peuvent permettre des dosages quantitatifs. Plusieurs essais immunoenzymatiques pour les IgG tels que le test Behring Enzygnost utilisent une technique légèrement modifiée pour mettre en évidence une augmentation significative des anticorps entre les prélèvements de sérum aux stades aigu et convalescent. Sinon, des prélèvements appariés peuvent être envoyés à un centre de référence pour la fixation du complément, l'inhibition de l'hémagglutination ou le test de séro-neutralisation par réduction des plages.

Information on Measles Serologic Testing

- Measles specific IgM antibodies appear around the time of rash onset and persist for at least 28 days.
- Measles specific IgG antibodies appear around the same time as IgM antibodies.
- A single blood specimen collected 3 to 28 days after rash onset is usually satisfactory for IgM serology.
- IgG serology using paired "acute" and "convalescent" specimens is a reliable test for diagnosing measles, provided that specimens are collected at the appropriate times.
- For IgG serology, the first (acute) sample should be obtained as soon as possible after the onset of the rash and, in any event, no later than 7 days afterwards. The second (convalescent) sample should be collected 10 to 20 days after the first sample. These paired sera must be tested simultaneously.

The timing of specimen collection should always be considered in the interpretation of a laboratory result. Samples from early acute phase (i.e. those drawn before 3 days after rash onset) are more likely to test falsely IgM negative compared with those drawn 3 to 28 days after rash onset. For this reason, a second blood sample is indicated if the IgM serology results from an early acute phase sample are inconclusive or negative for measles, rubella, and parvovirus B19, and the person meets the clinical case definition for measles.

Sporadic cases, i.e. those cases with no epidemiologic link to a laboratory-confirmed case, nor having recent travel history to an area with known measles activity, must be laboratory-confirmed by measles virus isolation or have a demonstrated rise in IgG titre between acute and convalescent serum specimens. A false IgM positive result in a sporadic case is likely, even with highly specific IgM assays, due to the very low incidence of disease in Canada; therefore, IgM serology is not a reliable test in this particular situation.

Information on Virus Isolation and/or Culture

Measles virus is present during the acute stage in throat and nasopharyngeal secretions for up to 4 days and is excreted in urine for at least 7 days after rash onset. Virus isolation should be attempted for all sporadic cases of measles and cases occurring early in a measles outbreak. With identification of a suspected measles case, the clinician should collect at least one appropriate specimen for virus isolation, in addition to blood for serology. If blood is not collected and the specimen obtained for virus isolation is required for laboratory confirmation of the case, the laboratory should be notified by phone. This should be documented on the requisition.

The isolation of measles virus may not always be successful. In an outbreak, specimens should be collected from several cases to increase the success of virus isolation and subsequent genotyping.

Direct detection of measles virus RNA in clinical specimens by reverse transcription-polymerase chain reaction is a potentially rapid option which can be used in addition to virus isolation. Contact the Viral Exanthemata Laboratory, LCDC, for procedural details.

Information concernant les tests sérologiques de la rougeole

- Les anticorps IgM spécifiques à la rougeole apparaissent à peu près au moment de l'apparition de l'éruption et persistent pendant au moins 28 jours.
- Les anticorps IgG spécifiques à la rougeole apparaissent à peu près en même temps que les anticorps IgM.
- Un seul prélèvement sanguin recueilli entre 3 et 28 jours après l'apparition de l'éruption est généralement satisfaisant en ce qui concerne la sérologie IgM.
- La sérologie IgG utilisant des échantillons appariés prélevés aux stades «aigu» et «convalescent» est un test fiable pour le diagnostic de la rougeole à condition que les prélèvements soient recueillis aux moments appropriés.
- Pour la sérologie IgG, le premier échantillon (aigu) devrait être obtenu aussitôt que possible après l'apparition de l'éruption, et de toute façon, dans les 7 jours suivants. Le second échantillon (convalescent) devrait être recueilli de 10 à 20 jours après le premier. Ces deux échantillons de sérum appariés doivent être testés simultanément.

Il importe de toujours tenir compte du moment de prélèvement des échantillons dans l'interprétation des résultats des tests de laboratoire. Les échantillons du début de la phase aiguë (c.-à-d. ceux qui ont été prélevés dans les 3 premiers jours suivant l'apparition de l'éruption) risquent davantage de donner un résultat faussement négatif pour les IgM que ceux prélevés entre 3 et 28 jours après l'apparition de l'éruption. Un second échantillon de sang est donc recommandé si la sérologie IgM effectuée sur un échantillon du début de la phase aiguë donne un résultat non concluant ou négatif pour la rougeole, la rubéole ou le parvovirus B19 et que la personne satisfait à la définition de cas clinique de la rougeole.

Les cas sporadiques, c'est-à-dire ceux pour lesquels il n'existe pas de lien épidémiologique avec un cas confirmé en laboratoire et qui n'ont pas d'antécédents de voyage récent dans une région où l'on sait qu'il y a des cas de rougeole, doivent être confirmés en laboratoire par isolement du virus ou afficher une élévation démontrée du titre des IgG entre les échantillons de la phase aiguë et ceux de la phase de convalescence. Un résultat faussement positif pour les IgM est probable chez un cas sporadique, même si l'on utilise une épreuve hautement spécifique pour les IgM, en raison de la très faible incidence de la maladie au Canada. Aussi la sérologie pour les IgM n'est pas un test fiable dans cette situation particulière.

Information sur l'isolement et/ou la culture du virus

Au moment de la phase aiguë, le virus de la rougeole est présent jusqu'à 4 jours dans les sécrétions de la gorge et du nasopharynx et il est excrété dans l'urine pendant au moins 7 jours après l'apparition de l'éruption. On devrait tenter d'isoler le virus chez tous les cas sporadiques de rougeole et pour les premiers cas d'une épidémie. Lors de l'identification d'un cas soupçonné de rougeole, le clinicien devrait recueillir au moins un prélèvement pour l'isolement du virus ainsi que du sang pour la sérologie. Si l'on n'a pas prélevé de sang et que le prélèvement obtenu pour l'isolement du virus est requis pour la confirmation du cas en laboratoire, le laboratoire devrait en être informé par téléphone. Cette information devrait être aussi être indiquée sur la demande.

Il n'est pas toujours possible d'isoler le virus de la rougeole dans tous les cas. Lors d'une éclosion, il faudrait recueillir des prélèvements chez plusieurs individus afin d'augmenter les chances d'isoler le virus et d'identifier son génotype.

La détection directe de l'ARN du virus de la rougeole dans des échantillons cliniques à l'aide de la méthode PCR-CDNA s'avère une option susceptible d'être assez rapide laquelle peut servir en sus de l'isolement du virus. Communiquez avec le laboratoire d'exanthèmes viraux, pour en obtenir le détail des procédures.

The Public-Health Role

The provincial or territorial epidemiologist should ensure that the following policy and procedures are in place locally.

1. A method for informing and updating all physicians and local public-health authorities regarding the issues surrounding measles surveillance, specifically as follows:

   - Any case of rash illness meeting the clinical case definition for measles must be immediately reported to the local public-health authority.
   - Laboratory confirmation is essential for all cases of measles where there is no epidemiologic link to a confirmed case. A blood sample of at least 3 mL (e.g. full pediatric tube) should be taken for laboratory diagnosis.
   - The blood sample should be taken early in the illness, ideally between 3 and 7 days after onset of rash (at most 28 days after rash onset). If blood drawn before 3 days after rash onset is found to be negative for specific IgM antibodies against measles, rubella, and parvovirus B19 in a person who meets the clinical case definition for measles, a second specimen is indicated.
   - A blood specimen from suspected measles cases will also be screened for parvovirus B19 and rubella specific IgM. Although the differential diagnosis of rash is not limited to these viral illnesses, these are the most likely to be confused with measles and therefore the most important to rule out in Canada.
   - In addition to the blood sample, a urine specimen and/or nasopharyngeal swab or throat swab should be obtained for virus isolation. A nasopharyngeal or throat swab should be obtained within 4 days of onset of the rash and/or approximately 50 mL to 100 mL of sterile urine should be obtained within 7 days of onset of rash.
   - For successful measles virus isolation, the specimen must be collected, as described in Appendix D, and transported on ice (4° C) to the laboratory as soon as possible. Specimens must be processed by the laboratory within 48 hours after collection. LCDC can perform the sample processing and virus isolation should this be necessary.
   - If blood is not collected or cannot be obtained from a suspected measles case and a specimen obtained for viral isolation is available, the laboratory should be notified by phone that virus isolation will be required for laboratory confirmation of the case. This should be documented on the requisition.
   - It is essential for successful epidemiologic analysis of suspected measles cases, that a contact name and phone number, as well as the following information, be submitted to the laboratory with all specimens (see Appendix C):

     - name of institution sending specimen
     - patient identifier
     - patient name
     - date of birth
     - sex
     - city, county (municipality)
     - date of fever onset
     - date of rash onset

Le rôle de la santé publique

L'épidémiologiste provincial ou territorial devrait s'assurer que les politiques et les procédures suivantes sont en place à l'échelon local.

1. Une méthode pour informer et tenir tous les médecins et les services de santé publique locaux au courant des questions liées à la surveillance de la rougeole, notamment :

   - Tout cas d'éruption répondant à la définition d'un cas «suspect» de rougeole doit être déclaré immédiatement au service local de santé publique.
   - La confirmation par un laboratoire est essentielle pour tous les cas de rougeole n'ayant aucun lien épidémiologique avec un cas confirmé. Il faudrait prélever un échantillon de sang d'au moins 3 mL (par ex., un plein tube pédiatrique) en vue du diagnostic en laboratoire.
   - L'échantillon de sang devrait être prélevé au début de la maladie, idéalement entre 3 et 7 jours après l'apparition de l'éruption (au plus 28 jours après l'apparition de l'éruption). Si le sang prélevé moins de 3 jours après l'apparition de l'éruption est négatif pour les anticorps IgM spécifiques à la rougeole, la rubéole et au parvovirus B19 chez une personne qui satisfait à la définition de cas clinique de la rougeole, il est recommandé d'effectuer un second prélèvement.
   - Le sang provenant de cas suspects de rougeole sera également contrôlé pour les IgM spécifiques au parvovirus B19 et à la rubéole. Bien que le diagnostic différentiel de l'éruption ne soit pas limité à ces maladies virales, ce sont celles qui risquent le plus d'être confondues avec la rougeole et donc les plus importantes à écarter au Canada.
   - En plus de l'échantillon de sang, un prélèvement d'urine et/ou un écouvillonnage du nasopharynx ou un prélèvement de gorge devraient être obtenus en vue de l'isolement du virus. Il faudrait obtenir un écouvillonnage du nasopharynx ou un prélèvement de gorge dans les 4 jours suivant l'apparition de l'éruption et/ou un échantillon d'environ 50 mL à 100 mL d'urine stérile, dans les 7 jours suivant l'apparition de l'éruption.
   - Afin de maximiser les chances d'isoler le virus de la rougeole, le prélèvement doit être recueilli de la manière décrite dans l'Annexe D et transporté sur de la glace (4 °C) au laboratoire aussitôt que possible. Les prélèvements doivent être traités par le laboratoire dans les 48 heures de la collecte. Le LLCM peut traiter l'échantillon et procéder à l'isolement du virus, si nécessaire.
   - Si un échantillon de sang n'est prélevé ou ne peut être obtenu chez un cas soupçonné de rougeole et que seul un prélèvement pour l'isolement du virus est disponible, le laboratoire devrait être informé par téléphone que l'isolement du virus sera nécessaire pour la confirmation du cas. Cette information devrait apparaître sur la requête.
   - Il est indispensable pour l'analyse épidémiologique des cas suspects de rougeole que le nom et le numéro de téléphone d'une personne à contacter ainsi que les renseignements énumérés ci-dessous soient fournis avec tous les prélèvements soumis au laboratoire (voir Annexe C) :

     - nom de l'établissement qui envoie le prélèvement
     - code d'identification du patient
     - nom du patient
     - date de naissance
     - sexe
     - ville, comté (municipalité)
     - date de l'apparition de la fièvre
     - date de l'apparition de l'éruption.

In addition, the public-health authority will need to know the following:
- whether case meets clinical case definition (see Appendix A)
- number of doses of measles vaccine received
- date of last measles vaccination
- date of collection

2. A means for transporting and processing of blood specimens for the serologic screen of rash.
3. A means for transporting and processing of specimens taken for virus isolation.
4. A policy and mechanism for the laboratory to notify the local public-health authority of all positive measles and rubella results within 24 hours of the results becoming available.
5. A policy and mechanism for the local public-health authority to notify the provincial public-health authority of all positive measles and rubella results within one business day of the results becoming available.

The Laboratory's Role

The provincial or territorial laboratory must ensure the following regarding serologic testing.

1. All serum specimens submitted from suspected measles cases are also screened for specific IgM antibodies against parvovirus B19 and rubella, constituting a "red rash screen," with a turnaround time of no more than 72 hours. Ideally these tests would all be done in a single laboratory.
2. Health professionals are aware of the appropriate timing of specimen collection for serologic testing and know that at least 3 mL of blood (e.g. one full pediatric tube) should be collected
3. Only kits recommended by WGMEC are used to test for measles specific IgM (see Appendix E). The United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC) measles IgM capture method, which is used at LCDC, is also a sensitive and specific assay which can be used for measles IgM serology. Serum specimens testing positive for measles IgM by a non-recommended assay are to be forwarded to LCDC for testing by the IgM capture assay or re-tested using a recommended commercial assay.
4. The laboratory that performs the serologic tests reports all results to the physician who ordered the test on the day they become available, and all positive results for measles and rubella to the local public-health authority within 24 hours of the results becoming available.

The provincial or territorial laboratory must ensure the following regarding virus isolation and/or culture.

1. Laboratories are prepared to advise clients as to the optimal time for specimen collection and provide handling instructions, specifically as follows:
   - A nasopharyngeal or throat swab must be collected within 4 days after onset of the rash and a sterile urine specimen

De plus, le service de santé publique devra avoir les renseignements suivants :
- si le cas correspond à la définition de cas clinique (voir Annexe A)
- le nombre de doses de vaccin antirougeoleux reçues
- la date de la dernière vaccination antirougeoleuse
- la date de prélèvement du spécimen.

2. Un moyen pour transporter et traiter les échantillons de sang en vue du dépistage sérologique de l'éruption.
3. Un moyen pour transporter et traiter les échantillons recueillis en vue de l'isolement du virus.
4. Une politique exigeant que le laboratoire informe le service local de santé publique de tout résultat positif obtenu concernant la rougeole et la rubéole dans les 24 heures suivant l'obtention des résultats en question assortie du mécanisme nécessaire.
5. Une politique exigeant que le service de santé publique informe le service provincial ou territorial de santé publique de tout résultat positif concernant la rougeole et la rubéole dans un délai de 1 jour ouvrable suivant l'obtention des résultats en question assortie du mécanisme nécessaire.

Le rôle du laboratoire

Le laboratoire provincial ou territorial doit s'assurer que les conditions suivantes sont respectées en ce qui concerne les tests sérologiques.

1. Tous les échantillons de sérum provenant de cas soupçonnés de rougeole sont également contrôlés pour les anticorps IgM spécifiques au parvovirus B19 et à la rubéole, ce qui constitue un «dépistage des maladies érythémateuses», dans un délai d'exécution maximal de 72 heures. Idéalement, ces tests devraient tous être effectués dans le même laboratoire.
2. Les professionnels de la santé connaissent les délais à respecter pour la collecte des prélèvements pour les tests sérologiques et savent qu'ils doivent recueillir au moins 3 mL de sang (p. ex., un plein tube pédiatrique).
3. Seules les trousses recommandées par le GTERC sont utilisées pour détecter les IgM spécifiques à la rougeole (voir Annexe E). La méthode par immunocapture de l'IgM de la rougeole des Centers for Disease Control and Prevention des États-Unis, qui est utilisée au LLCM, est également une épreuve sensible et spécifique qui peut être utilisée pour la sérologie des IgM de la rougeole. Les spécimens de sérum pour lesquels on obtient des résultats positifs pour les IgM de la rougeole par des méthodes non recommandées doivent être envoyés au LLCM pour être testés par l'épreuve d'immunocapture de l'IgM ou encore ils doivent être testés de nouveau à l'aide d'une trousse commerciale recommandée.
4. Le laboratoire qui effectue les tests sérologiques communique tous les résultats au médecin qui a demandé le test le jour où ils sont disponibles, et tous les tests positifs pour la rougeole et la rubéole sont déclarés au service local de santé publique dans les 24 heures suivant l'obtention des résultats en question.

Le laboratoire provincial ou territorial doit s'assurer que les conditions suivantes sont respectées en ce qui concerne l'isolement et/ou la culture du virus.

1. Que les laboratoires sont préparés à informer les clients du moment optimal pour la collecte des prélèvements et à leur fournir des instructions relatives à la manipulation, particulièrement :
   - Un écouvillonnage du nasopharynx ou un prélèvement de gorge doit être obtenu dans les 4 jours suivant l'apparition de l'éruption et un

(approximately 50 mL to 100 mL) within 7 days of rash onset, in order to increase the probability of isolating the virus.

- All specimens should be placed on ice and immediately transported to the laboratory for proper processing (see Appendix D).
- Specimens should be processed within 48 hours, or frozen at –70° C in viral transport medium (see Appendix D).

2. A procedure is in place for transferring specimens to a laboratory where virus isolation can be undertaken, and clients and the local public-health authorities are made aware of this procedure. For those laboratories that do not undertake virus isolation, the LCDC Viral Exanthemata Laboratory can provide sample processing and virus isolation services.
3. Procedures are in place to send measles virus isolates from the testing laboratory to LCDC for genotypic analysis. LCDC should ensure that results of the genotypic analysis are forwarded to the isolating laboratory, within one business day of receipt of the results. The isolating laboratory should provide the results to the local public-health authority and to the provincial public-health authority within one business day of LCDC's notification.
4. If the viral isolation was required for laboratory confirmation of a case, (i.e. if no serology was carried out), then
   - the result of the viral isolation attempt is communicated to the physician, who ordered the test, on the day it becomes available; and
   - the laboratory reports all positive results to the local public-health authority within 24 hours of the results becoming available.

The provincial or territorial laboratory should ensure the following regarding proficiency testing.

Since it is important to maintain a high level of proficiency in providing measles diagnostic services across the country, LCDC will offer proficiency testing programs. All laboratories providing measles diagnostic services should participate in these programs.

prélèvement d'urine stérile (environ 50 mL à 100 mL) devrait être obtenu dans les 7 jours suivant l'apparition de l'éruption afin d'augmenter les chances d'isolement du virus.

- Tous les prélèvements devraient être placés sur de la glace et transportés immédiatement au laboratoire pour subir les analyses appropriées (voir Annexe D).
- Les prélèvements devraient être traités dans les 48 heures ou congelés à –70 °C dans un milieu de transport viral (voir Annexe D).

2. Une procédure établie est en place pour le transport des prélèvements vers un laboratoire qui peut isoler le virus, et les clients ainsi que les services locaux de santé publique connaissent cette procédure. Pour les laboratoires qui ne sont pas en mesure d'isoler le virus, le Laboratoire national des exanthèmes viraux du LLCM peut fournir des services de traitement des prélèvements et d'isolement des virus.
3. Il existe des procédures pour expédier les isolats viraux au LLCM pour analyse génotypique. Le LLCM devrait s'assurer que les résultats de l'analyse génotypique sont envoyés au laboratoire qui a fait l'isolement dans la journée ouvrable suivant la réception des résultats. Le laboratoire qui a effectué l'isolement devrait fournir les résultats au service local de santé publique et au service provincial ou territorial de santé publique dans la journée ouvrable suivant la réception du résultat du LLCM.
4. Si l'isolement viral a été exigé pour la confirmation d'un cas en laboratoire (c.-à-d. si aucune sérologie n'a été réalisée), alors :
   - le résultat de la tentative d'isolement du virus est communiqué au médecin qui a demandé le test le jour même où ce résultat devient disponible; et
   - le laboratoire déclare tous les résultats positifs au service local de santé publique dans les 24 heures suivant leur obtention.

Le laboratoire provincial ou territorial doit s'assurer que les conditions suivantes sont respectées en ce qui concerne les épreuves de compétence.

Puisqu'il est important de conserver un haut niveau de compétence dans la fourniture des services de diagnostic de la rougeole au Canada, le LLCM offrira des programmes de vérification de la compétence. Tous les laboratoires fournissant des services de diagnostic de la rougeole doivent participer à ces programmes.

Appendix A

NATIONAL SURVEILLANCE MEASLES CASE DEFINITIONS

Confirmed Case

A confirmed case is characterized by one of the following:

- laboratory confirmation of infection* in the absence of recent (1 to 14 days) immunization with measles-containing vaccine:
  - isolation of measles virus from an appropriate clinical specimen
  - or, significant rise in measles specific antibody titre between acute and convalescent sera
  - or, positive serologic test for measles IgM antibody using a recommended assay
- **or**, clinical measles in a person who is epidemiologically linked to a laboratory-confirmed case

Clinical Case

A clinical case is characterized by all of the following:

- fever ≥ 38.3° C
- cough, coryza, or conjunctivitis
- generalized maculopapular rash for at least 3 days

* A laboratory-confirmed case does not have to meet the clinical illness description.

Annexe A

DÉFINITIONS DE CAS DE LA ROUGEOLE UTILISÉES POUR LA SURVEILLANCE NATIONALE

Cas confirmé

Un cas confirmé est caractérisé par la présence de l'un des facteurs suivants :

- la confirmation en laboratoire de l'infection* en l'absence d'une immunisation récente (1 à 14 jours) avec un vaccin contenant l'antigène rougeoleux :
  - isolement du virus à partir d'un spécimen clinique approprié
  - augmentation significative du titre des anticorps spécifiques de la rougeole entre les sérums prélevés en phase aiguë et en phase convalescente
  - ou, résultat positif à un test sérologique de détection des anticorps IgM de la rougeole réalisé à l'aide d'une méthode recommandée
- **ou,** un cas de rougeole clinique chez une personne qui est un contact connu d'un cas confirmé en laboratoire.

Cas clinique

Un cas clinique est caractérisé par tous les symptômes suivants :

- une fièvre de ≥ 38,3 °C
- une toux, un coryza ou une conjonctivite
- une éruption maculo-papuleuse généralisée pendant au moins 3 jours.

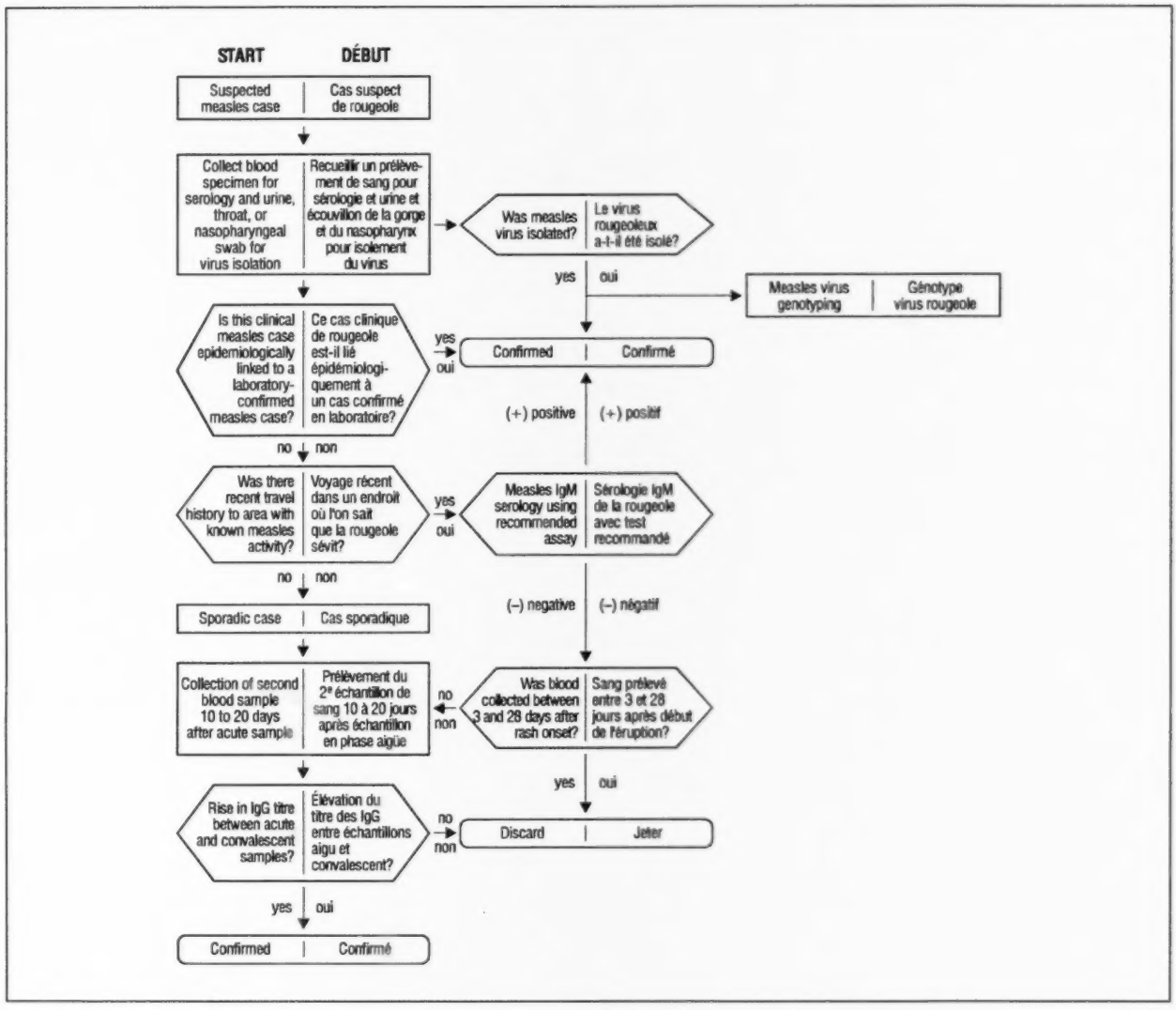
* Un cas confirmé en laboratoire n'a pas à satisfaire à la description de cas clinique.

Appendix B

MEASLES CASE LABORATORY INVESTIGATION DECISION TREE

Annexe B

ARBRE DE DÉCISION POUR L'INVESTIGATION EN LABORATOIRE DES CAS DE ROUGEOLE


START
DÉBUT
Suspected measles case
Cas suspect de rougeole
Collect blood specimen for serology and urine, throat, or nasopharyngeal swab for virus isolation
Recueillir un prélèvement de sang pour sérologie et urine et écouvillon de la gorge et du nasopharynx pour isolement du virus
Was measles virus isolated?
Le virus rougeoleux a-t-il été isolé?
yes
oui
Measles virus genotyping
Génotype virus rougeole
Is this clinical measles case epidemiologically linked to a laboratory-confirmed measles case?
Ce cas clinique de rougeole est-il lié épidémiologiquement à un cas confirmé en laboratoire?
yes
oui
Confirmed
Confirmé
(+) positive
(+) positif
no
non
Was there recent travel history to area with known measles activity?
Voyage récent dans un endroit où l'on sait que la rougeole sévit?
yes
oui
Measles IgM serology using recommended assay
Sérologie IgM de la rougeole avec test recommandé
no
non
(–) negative
(–) négatif
Sporadic case
Cas sporadique
Collection of second blood sample 10 to 20 days after acute sample
Prélèvement du 2e échantillon de sang 10 à 20 jours après échantillon en phase aigüe
no
non
Was blood collected between 3 and 28 days after rash onset?
Sang prélevé entre 3 et 28 jours après début de l'éruption?
yes
oui
Rise in IgG titre between acute and convalescent samples?
Élévation du titre des IgG entre échantillons aigu et convalescent?
no
non
Discard
Jeter
yes
oui
Confirmed
Confirmé

Considerations

- Laboratory confirmation of measles assumes the absence of recent measles vaccination.
- All suspected measles cases must test negative for parvovirus B19 and rubella virus.
- Interpretation of laboratory results must always consider the timing of specimen collection.
- The final decision for determination of a true measles case must consider clinical, laboratory, and epidemiologic data.

Considérations

- La confirmation en laboratoire de la rougeole suppose qu'il n'y a pas eu une vaccination récente contre la rougeole.
- Tous les cas suspects de rougeole doivent obtenir un résultat négatif pour le parvovirus B19 et le virus de la rubéole.
- L'interprétation des résultats de laboratoire doit toujours tenir compte du moment auquel ont été prélevés les échantillons.
- La décision finale dans la détermination d'un vrai cas de rougeole doit être fondée sur des données cliniques et épidémiologiques et des données de laboratoire.

Appendix C

REQUISITION FOR VIRAL EXANTHEMATA

Canadian Science Centre for Human and Animal Health
Viral Exanthemata, LCDC
1015 Arlington Street
Winnipeg, Man. R3E 3R2

Telephone: 204-789-6080

Annexe C

DEMANDE RELATIVE AUX EXANTHÈMES VIRAUX

Centre scientifique canadien de santé humaine et animale
Laboratoire des exanthèmes viraux, LLCM
1015 rue Arlington
Winnipeg (Manitoba) R3E 3R2

Téléphone : 204-789-6080

SENDER INFORMATION
INFORMATION SUR L'EXPÉDITEUR

Sender/Expéditeur – Laboratory No./N° de laboratoire : _____

_____

Name/Nom : _____

Address/Adresse : _____

_____

_____

_____

City/Ville : _____

Province : _____

Postal code/Code postal : _____

Telephone/Téléphone : _____

PATIENT INFORMATION
INFORMATION SUR LE PATIENT

Name/Nom : _____

Date of birth/Date de naissance : _____

Sex/Sexe : M _____ F _____

City/Ville : _____

Type of specimen/Type de spécimen : _____

_____

_____

Date taken/Date de prélèvement : _____

Test requested/Test requis : _____

_____

Date of Onset of Disease/Début de la maladie : _____

Symptoms, Clinical Diagnosis/Symptômes, diagnostic cliniques : _____

_____

_____

MEASLES ONLY/LA ROUGEOLE SEULEMENT

Date of rash onset/Date du début de l'éruption : _____

Date of fever onset/Date du début de la fièvre : _____

No. of doses of measles vaccine received/Nombre de doses de vaccins antirougeoleux reçues : _____

Date of last measles vaccination/Date de la dernière vaccination antirougeoleuse : _____

Appendix D

MEASLES VIRUS ISOLATION

Background

Measles virus isolation is a definitive means of establishing the diagnosis of measles. Measles culture has become a more reliable tool with the use of B95-8 cell line, an Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell line known to be quite sensitive in isolating measles virus from clinical specimens. As progress is made toward elimination of measles in the Americas, it will be critical to examine virus isolates from as many outbreaks and sporadic cases as possible for strain surveillance and to identify the source of the virus. From this standpoint, viral isolation is important. Automated DNA sequencing techniques are now available for rapid genetic characterization of viral isolates. This, together with the existence of a database of nucleic acid sequence information, now makes it possible to identify the source of wild-type viruses and rapidly differentiate between wild-type and vaccine strains.

Virus isolation can take several days to weeks. Therefore, **IgM serology should always be the first priority** in laboratory diagnosis of measles. Specimens for virus isolation should be taken **at the same time** that blood is obtained, since a delay in collection will reduce the chance of isolating the virus. Nasopharyngeal, or throat swab, or urine specimens should not be substituted for blood which is required for serologic diagnosis.

Protocols for Isolation of Measles Virus*

Specimens for virus isolation should be obtained as soon as possible after the onset of rash. Always collect a urine specimen and, if possible, attempt to collect a nasopharyngeal or throat specimen.

Specimen Collection and Processing

Respiratory Specimens (nasopharyngeal or throat swabs)

1. Obtain the sample as soon as possible after onset of rash but no later than 4 days afterwards.
2. Use sterile swabs to obtain nasopharngeal or throat specimens. The virus is cell-associated, so attempt to swab the throat and nasal passages to collect epithelial cells. Place the swabs in a tube containing 2 mL to 3 mL of VTM (viral transport medium: PBS or suitable isotonic solution such as Hank's BBS containing antibiotics [100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin], and either 2% fetal bovine serum [FBS] or 0.5% gelatin).
3. Keep all specimens under refrigeration (4° C), and ship as soon as possible on wet ice to the laboratory for processing.

* Original protocols, except for the shell vial method, are based on the method of Dr. William Bellini, Measles Section, CDC.

Annexe D

ISOLEMENT DU VIRUS DE LA ROUGEOLE

Historique

L'isolement du virus de la rougeole est un moyen d'établir un diagnostic définitif de la rougeole. La culture du virus de la rougeole est maintenant un moyen plus fiable grâce à l'utilisation de la lignée de cellules B95-8, soit une lignée de cellules lymphoblastoïdes transformées par le virus Epstein-Barr, reconnues comme étant très sensibles pour l'isolement du virus de la rougeole des prélèvements cliniques. À mesure qu'on s'approchera de l'objectif de l'éradication de la rougeole dans les Amériques, il sera de plus en plus important d'examiner les isolats de virus provenant d'autant d'épidémies et de cas sporadiques possible pour la surveillance des souches et d'identifier leur source. De ce point de vue, l'isolement du virus est important. Il existe maintenant des techniques automatisées de séquençage de l'ADN pour effectuer la caractérisation génétique des isolats viraux. Ces techniques, en plus de la base de données renfermant de l'information sur les séquences nucléotidiques, permettent maintenant d'identifier la source de virus sauvages et de faire rapidement la distinction entre les souches de type sauvage et vaccinales.

L'isolement du virus peut prendre plusieurs jours, voire des semaines. Aussi, faut-il toujours **accorder la priorité à la sérologie des IgM** pour effectuer le diagnostic en laboratoire de la rougeole. On doit recueillir des prélèvements en vue de l'isolement du virus **en même temps** que les prélèvements sanguins, car un retard dans la collecte réduira les chances d'isoler le virus. On ne doit pas prendre des écouvillonnages du nasopharynx ou des prélèvements de gorge ou des échantillons d'urine au lieu d'un prélèvement sanguin, car celui-ci est requis pour le diagnostic sérologique.

Protocoles pour l'isolement du virus de la rougeole*

On devrait obtenir des prélèvements pour tenter l'isolement du virus dès que possible après l'apparition d'une éruption. Il faut toujours obtenir un échantillon d'urine et, si possible, essayer d'obtenir un écouvillonnage du nasopharynx ou de la gorge.

Prélèvement et traitement des échantillons

Échantillons respiratoires (écouvillonnages du nasopharynx ou prélèvements de gorge)

1. Obtenir un échantillon aussitôt que possible après l'apparition de l'éruption, au plus tard 4 jours après.
2. Utiliser des écouvillons stériles pour obtenir des prélèvements du nasopharynx ou de la gorge. Comme le virus est associé aux cellules, il faut essayer d'écouvillonner la gorge et les voies nasales pour prélever des cellules épithéliales. Placer les écouvillons dans un tube contenant de 2 mL à 3 mL de milieu de transport viral (soit : saline tamponnée au phosphate ou une solution isotonique appropriée comme le milieu de culture «Hank's BBS» contenant des antibiotiques [100 unités/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine] et soit du sérum de foetus bovin [SFB] à 2 % ou de la gélatine à 0,5 %).
3. Conserver tous les prélèvements au réfrigérateur (approximativement 4 °C) et les expédier au laboratoire dès que possible pour analyse, en prenant soin de les mettre sur de la glace humide.

* Les protocoles originaux, sauf celui de la méthode du tube à fond plat avec lamelle, sont basés sur la méthode du Dr William Bellini, Section de la rougeole, Centers for Disease Control and Prevention aux É.-U.

4. In the laboratory, remove swabs from the VTM after allowing at least an hour for elution of the virus. Centrifuge the eluant at 2500 x g for 15 minutes at 4° C. Resuspend the pellet in 1 mL of tissue culture medium. If possible, save the supernatant in a separate tube. Either proceed directly with virus isolation (specimens may be held at 4° C for up to 24 hours), or freeze the samples at –70° C and ship on dry ice to the appropriate laboratory for virus isolation.

Urine Specimens

1. Collect 50 mL to 100 mL of urine within 7 days after rash onset.
2. Keep urine at 4° C and process within 48 hours at the latest.
3. Centrifuge 50 mL urine at 2500 x g for 15 minutes at 4° C to pellet the sediment. Resuspend the sediment in 2 mL VTM or any cell culture medium (e.g. DMEM, EMEM, RPMI plus antibiotics). Either proceed directly with virus isolation or freeze the samples at –70° C and ship on dry ice to the appropriate laboratory for virus isolation.

If centrifugation cannot be done, **do not freeze the urine sample**. The entire urine specimen should be held under refrigeration and shipped to the appropriate laboratory on wet ice. Seal the specimen container to prevent leakage.

Virus Isolation

B95-8 (B95-a) Cell Line

B95-8 is the preferred cell line for primary isolation of measles virus[1], and this cell line is available from the American Type Culture Collection (No. CRL 1612). Note that **this cell line should be handled as an infectious cell line capable of yielding Epstein-Barr virus.**

The B95-8 cells grow lightly attached to the culture surface when grown in DMEM supplemented with 1 x antibiotics (100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin), 0.25 µg/mL amphotericin (fungizone), and FBS. Cell growth is sustained by adding 5% to 10% FBS. Under these conditions, B95-8 cells grow as an adherent monolayer and are referred to as B95-a cells. FBS is used at a 2% concentration for cell maintenance during viral isolation. Grow cells in a moist CO_2 incubator at 37° C. Cell stocks can be stored frozen at –70° C using standard cryoprotection medium (50% FBS, 10% DMSO, 40% DMEM).

The B95-a cells can be passaged by briefly treating the cell monolayers with 0.05% trypsin-EDTA to release cells from the tissue culture surface. Be careful not to over-trypsinize. Neutralize trypsin by adding DMEM containing 10% FBS. Usually the cells from a single monolayer culture can be split in a ratio of 1:3. The cells tend to become "floaters" growing in clumps suspended in the medium as the cell density increases. These cells are viable and can be passaged by gentle pipetting to break up the clumps then replating to a lower cell density.

The B95-a cells can be transported at room temperature in a 75 cm^2 or 25 cm^2 tissue culture flask with additional medium added to help keep cells attached. After shipment, look at the cell sheet. If many cells are free-floating, a light spin of the medium will recover cells, which can be added back to the flask or to another flask for

4. Au laboratoire, retirer les écouvillons du milieu de transport viral après avoir attendu au moins 1 heure pour permettre l'élution du virus. Centrifuger ensuite l'éluat 15 minutes à 2 500 x g, à 4 °C. Resuspendre le culot dans 1 mL de milieu de culture de tissus. Si possible, conserver le surnageant séparément dans une autre éprouvette. Procéder ensuite à l'isolement du virus (les prélèvements peuvent être conservés à 4 °C pendant 24 heures) ou congeler les échantillons à –70 °C et les expédier sur de la glace sèche au laboratoire approprié pour l'isolement du virus.

Prélèvements d'urine

1. Prélever de 50 mL à 100 mL d'urine dans les 7 jours qui suivent l'apparition de l'éruption.
2. Conserver l'échantillon d'urine à 4 °C et procéder à l'analyse dans les 48 heures.
3. Au laboratoire, centrifuger 50 mL d'urine pendant 15 minutes à 2 500 x g, à 4 °C pour obtenir un culot. Resuspendre le sédiment dans 2 mL de milieu de transport viral ou tout autre milieu de culture (soit les milieux DMEM, EMEM ou RPMI avec antibiotiques). Procéder immédiatement à l'isolement du virus ou congeler les échantillons à –70 °C et les expédier sur de la glace sèche au laboratoire approprié pour l'isolement du virus.

S'il n'est pas possible de centrifuger les échantillons d'urine, **il ne faut pas les congeler**. On doit alors conserver l'urine au réfrigérateur et l'expédier, sur de la glace humide, au laboratoire approprié. Il faut prendre soin d'utiliser un contenant de transport approprié pour éviter les fuites.

Isolement du virus

Lignée de cellules B95-8 (B95-a)

La lignée de cellules B95-8 est la lignée de premier choix pour effectuer l'isolement primaire du virus de la rougeole[1], et on peut obtenir cette lignée de cellules de la American Type Culture Collection (n° CRL 1612). **Veuillez noter qu'on doit manipuler cette lignée de cellules comme une lignée de cellules infectieuses pouvant transmettre le virus Epstein-Barr.**

Les cellules B95-8 se propagent en adhérant légèrement à la surface du flacon de culture, lorsque cultivées dans du milieu de culture DMEM auquel on a ajouté 100 unités/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine, 0,25 µg/mL d'amphotéricine (fungizone) et du SFB. Dans ces conditions, lorsque les cellules B95-8 sont propagées en feuillet adhérent, on parle de cellules B95-a. Les cellules se propagent par l'ajout de SFB à une concentration de 5 % à 10 %. On utilise le SFB à 2 % pour maintenir les cellules pendant l'isolement du virus. Cultiver les cellules dans un incubateur humide avec CO_2 à 37 °C. On peut conserver une banque de cellules à –70 °C à l'aide d'un milieu de cryoprotection standard (SFB à 50 %, DMSO à 10 % et milieu de culture DMEM à 40 %).

On peut propager les cellules B95-a en dispersant le feuillet cellulaire par l'ajout de trypsine-EDTA à 0,05 % pour libérer les cellules de la surface du flacon. Prendre garde de limiter la durée du contact avec la solution dispersante. Neutraliser la trypsine en ajoutant le milieu de culture DMEM contenant du SFB à 10 %. Le ratio de dilution des cellules pour propagation est habituellement 1:3. Les cellules ont tendance à «flotter» et croissent agrégées en suspension dans le milieu au fur et à mesure que la densité des cellules augmente. Ces cellules sont viables et peuvent être réensemencées à une plus faible densité après un léger pipetage pour dissocier les amas.

On peut transporter les cellules B95-a à la température ambiante dans un flacon de culture de tissus de 75 cm^2 ou 25 cm^2, dans lequel on a ajouté du milieu de culture pour aider à conserver les cellules adhérentes. Lors de la réception, il faut examiner le feuillet cellulaire. Si vous remarquez qu'un grand nombre de cellules flottent librement, une légère centrifugation

passage. For maintenance, add 30mL to 50 mL of DMEM with 2% FBS to a 75 cm^2 flask.

B95-a cells infected with measles virus can show syncytium formation and giant-cell cytopathic effect (CPE) as early as 48 hours after inoculation. However, isolation-attempt cultures should be followed for 7 to 8 days with two to three blind passages before isolation of measles virus is ruled out.

Inoculation of Specimens for Measles Isolation (Flask Method – CDC)

1. Passage cells, split into 25 cm^2 flasks at 1:3 or 1:4, and incubate 24 to 48 hours. Cells should be at 75% to 85% confluency when the specimen is inoculated.
2. For inoculation, decant medium, add 1.0 mL to 1.5 mL DMEM with 2 x antibiotics and add 0.1 mL to 1.0 mL of specimen, depending on the concentration. Save all leftover specimens as they may still be useful for PCR analysis.
3. Incubate at 37° C for 1 hour.
4. Decant medium into bleach water; replace medium with 5mL to 10 mL of DMEM containing 2% FBS and 2 x antibiotics.
5. Change medium every 3 to 4 days, and passage cells by splitting at 1:3 every 7 to 9 days. Check for CPE daily.
6. Attempt at least three blind passages before terminating isolation attempt.
7. If CPE is visible, continue to feed the cells until the CPE becomes extensive. It may be necessary to passage the cells one more time to allow the CPE to progress. When CPE is maximal, pellet cells, resuspend the pellet in 1 mL of DMEM, and freeze at –70° C.
8. If a culture becomes contaminated, the original specimen can be diluted in DMEM and passed through a 0.45 µm nitrocellulose filter and used to inoculate fresh B95-a cells.
9. Confirmation of culture can be achieved by using fluorescent antibody staining or PCR.

Please remember to save some of the original clinical specimen. This material can be used for a second isolation attempt if problems occur with the first, and it can provide a specimen for direct RT-PCR analysis. (Contact the Viral Exanthemata Laboratory, LCDC, for details.)

Inoculation of Specimens for Virus Isolation (Shell Vial Method)

The shell vial method has been found to be quite convenient and highly successful by some laboratories in Canada. This method involves the following:

permettra la récupération de ces dernières qui pourront alors être rajoutées au flacon original. Pour leur maintien, ajoutez de 30 mL à 50 mL de milieu de culture DMEM contenant 2 % de SFB à un falcon de 75 cm^2.

Des cellules B95-a infectées par le virus de la rougeole peuvent démontrer la formation de syncytia et un effet cytopathique de cellules géantes 48 heures seulement suivant l'inoculation. Cependant, les cultures inoculées devraient être observées pendant 7 à 8 jours et devraient être divisées en aveugle deux ou trois fois avant que l'on puisse écarter la présence du virus de la rougeole.

Inoculation de prélèvements en vue de l'isolement du virus de la rougeole (méthode du flacon – CDC)

1. Procéder au passage des cellules, en les diluant 1:3 ou 1:4 dans des flacons de 25 cm^2, et les incuber pendant 24 à 48 heures. Le taux de confluence devrait se situer entre 75 % et 85 % au moment de l'inoculation du spécimen.
2. Pour l'inoculation, décanter le milieu de culture, ajouter de 1,0 mL à 1,5 mL de milieu de culture DMEM et des antibiotiques (2 x), puis ajouter de 0,1 mL à 1,0 mL du prélèvement, selon la concentration. Conserver le reste du prélèvement, car il peut encore être utile pour l'analyse par l'amplification en chaîne par polymérase (PCR).
3. Incuber à 37 °C pendant 1 heure.
4. Décanter le milieu de culture dans de l'eau de javel et le remplacer par 5 mL à 10 mL de milieu de culture DMEM contenant 2 % SFB et 2 x antibiotiques.
5. Changer le milieu de culture tous les 3 ou 4 jours et faire le passage des cellules en les séparant dans un rapport de 1:3 aux 7 à 9 jours. Vérifier la présence de l'effet cytopathologique tous les jours.
6. Faire au moins trois passages en aveugle avant de mettre fin à l'essai d'isolement du virus.
7. En présence de l'effet cytopathique, continuer à alimenter les cellules jusqu'à ce que l'effet cytopathique soit complet. Il peut être nécessaire de faire un passage additionnel pour permettre à l'effet cytopathique de prendre l'ampleur désirée. Lorsqu'il atteint son maximum, obtenir un culot de cellules, les resuspendre dans 1 mL de milieu de culture DMEM et congeler à –70 °C.
8. En cas de contamination d'un milieu de culture, on peut diluer le prélèvement original dans du milieu de culture DMEM, le filtrer sur membrane de nitrocellulose de 0,45 µm et ensuite l'utiliser pour inoculer des cellules fraîches B95-a.
9. La confirmation d'une culture peut se faire par immunofluorescence ou par PCR.

N'oubliez pas de conserver une petite quantité du prélèvement clinique original, car on pourrait s'en servir pour effectuer un deuxième essai d'isolement si des problèmes survenaient lors du premier essai. On pourrait également l'utiliser pour effectuer une analyse par RT-PCR directe. (Communiquer avec le Laboratoire des exanthèmes viraux pour obtenir plus de détails à cet égard.)

Inoculation de prélèvements aux fins d'isolement du virus (méthode du tube à fond plat avec lamelle)

Certains laboratoires au Canada considèrent que la méthode du tube à fond plat avec lamelle est très pratique et donne d'excellents résultats. Cette méthode comprend les étapes suivantes.

Maintenance of B95-8 cells

1. B95-8 cells are routinely maintained in a 25 cm^2 flask in an upright position. The cells, contained in 10 mL RPMI growth medium, settle to the bottom of the flask.
2. Without disturbing the cells, each week carefully remove 9 mL of growth medium and discard, leaving 1 mL of cell suspension. Add 9 mL of fresh growth medium (formula below). If additional cells are required, each flask can be split 1:3.
3. Trypsinization is not required because these cells do not attach. Reduction in the density of the cells can be accomplished by harvesting the cells through centrifugation and resuspending them in the fresh medium to the required density.
4. These cells can be maintained at −70° C in an appropriate cryoprotectant and easily retrieved when required.

Growth medium for B95-8 cells

- 500 mL RPMI 1640 (Gibco Cat. No. 21870-076 without glutamine).
- Aseptically remove and save 56 mL of the medium for other use.
- Add 50 mL FBS (heat inactivated) to the remaining 444 mL medium.
- Add 1 mL penicillin-gentamicin solution (final concentration: penicillin 100 units/mL, gentamicin 10 µg/mL).
- Add 5 mL 300 mM glutamine.

Inoculation

1. Inoculate two shell vials (containing coverslips) per specimen with 10^6 cells in 0.2 mL growth medium and 0.2 mL of specimen.
2. Centrifuge 1,000 x g for 45 minutes at room temperature.
3. Following centrifugation, remove inoculum and add 1 mL maintenance medium containing 2% FBS.
4. Incubate at 37° C and observe for syncytium formation at 48 hours and daily for up to 6 days.
5. When CPE is observed (at least 50% cells), or after 6 days incubation, centrifuge one vial at 900 x g for 10 minutes.

   If viral isolation is needed to confirm the case, follow steps 6 and 7.
6. Aspirate the maintenance medium from the vial, fix by adding 1 mL acetone and allow to sit for 15 minutes. Remove the acetone and wash with PBS to remove residual acetone.
7. Aspirate PBS and stain the coverslip (within the vial) with measles immunofluorescent stain according to the manufacturer's instructions (Light Diagnostics – Chemicon; distributed in Canada by Bio/Can).

   Otherwise inoculate fresh B95-8 cells in 75 cm^2 flask with virus until CPE is observed, and follow steps 7 and 8 of the *Flask Method* protocol.
8. If CPE is not observed after 6 days, the monolayer in the second shell vial can be scraped and passed to a fresh vial(s) for further incubation.

   Remember to save some of the original clinical specimen. This material can be used for a second isolation attempt if

Conservation des cellules B95-8

1. Les cellules B95-8 sont habituellement conservées dans un flacon de 25 cm^2 à la verticale. Conservées dans 10 mL de milieu de culture RPMI, les cellules se déposent au fond du flacon.
2. Sans remuer les cellules, enlever soigneusement 9 mL de milieu de croissance chaque semaine et le jeter, en laissant 1 mL de cellules en suspension. Ajouter 9 mL de milieu de croissance frais (se reporter à la formule ci-dessous). Si on a besoin de cellules supplémentaires, on peut séparer chaque flacon dans un rapport de 1:3.
3. Il n'est pas nécessaire de disperser les cellules avec de la trypsine parce que ces dernières n'adhèrent pas. On peut réduire la densité des cellules en les centrifugeant et en les resuspendant dans un milieu de croissance frais à la densité requise.
4. On peut conserver ces cellules à −70 °C dans un cryoprotecteur approprié et les récupérer plus tard au besoin.

Milieu de croissance pour les cellules B95-8

- 500 mL de milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, n° de cat. 21870-076, sans glutamine).
- Prélever stérilement 56 mL du milieu et le conserver pour usage ultérieur.
- Ajouter 50 mL de SFB (inactivé par la chaleur) au milieu de croissance qui reste, soit 444 mL.
- Ajouter 1 mL d'une solution de pénicilline-gentamicine (concentration finale de la pénicilline 100 unités/mL; la gentamicine 10 µg/mL).
- Ajouter 5 mL de glutamine 300 mM.

Inoculation

1. Pour chaque spécimen, inoculer deux tubes à fond plat avec lamelle avec 10^6 cellules dans 0,2 mL de milieu de croissance et 0,2 mL de spécimen.
2. Centrifuger 45 minutes à 1 000 x g à la température ambiante.
3. Après la centrifugation, enlever l'inoculum et ajouter 1 mL de milieu de maintien contenant 2 % SFB.
4. Incuber à 37 °C et vérifier 48 heures plus tard la formation de syncytia et ensuite quotidiennement jusqu'à 6 jours.
5. Lorsque l'effet cytopathique est remarqué (au moins 50 % des cellules), ou après 6 jours d'incubation, centrifuger un flacon 10 minutes à 900 x g.

   Si l'isolement du virus est effectué pour confirmer le cas, on doit suivre les étapes 6 et 7.
6. Aspirer le milieu de maintien du tube, fixer la lamelle en ajoutant 1 mL d'acétone et incuber 15 minutes. Enlever l'acétone et laver avec de la saline tamponnée au phosphate pour éliminer tout résidu d'acétone.
7. Aspirer la saline tamponnée au phosphate et incuber la lamelle avec l'anticorps anti-rougeole marqué à la fluorescéine (dans le tube) en suivant le mode d'emploi du fabricant (Light Diagnostics – Chemicon; distribué au Canada par Bio/Can).

   Sinon, inoculer des cellules B95-8 fraîches dans un flacon de 75 cm^2 avec le virus jusqu'à ce que l'effet cytopathique apparaisse; suivre ensuite les étapes 7 et 8 de la méthode du flacon.
8. Si aucun effet cytopathique n'est observé après 6 jours, on peut prélever le feuillet du deuxième tube en le raclant et le transférer dans un nouveau tube pour le faire incuber davantage.

   Il ne faut pas oublier de conserver une petite quantité du prélèvement clinique original, car on pourrait s'en servir pour effectuer un

problems occur with the first, as well as provide a specimen for direct RT-PCR analysis. (Contact the Viral Exanthemata Laboratory, LCDC, for details.)

Shipping of Measles Virus Isolates

Infected cells can be pelleted, resuspended in a small volume of DMEM and frozen at –70° C before shipping on dry ice.

The appropriate Transport Canada regulations for the safe shipment of infectious material and dangerous goods must always be followed.

Please contact LCDC concerning shipment of sera, clinical specimens, or virus isolates.

Viral Exanthemata Laboratory
Canadian Science Centre for Human and Animal Health
Laboratory Centre for Disease Control
1015 Arlington Street
Winnipeg, Man. R3E 3R2

Head: Dr. Graham Tipples
Telephone: 204-789-6080
Fax: 204-789-5009
E-mail: graham_tipples@hc-sc.gc.ca

deuxième essai d'isolement si des problèmes survenaient lors du premier essai. On pourrait également l'utiliser pour effectuer une analyse par RT-PCR directe. (Communiquer avec le Laboratoire des exanthèmes viraux du LLCM pour obtenir plus de détails à cet égard.)

Expédition des isolats du virus de la rougeole

Les cellules infectées peuvent être centrifugées, puis resuspendues dans un petit volume de DMEM et congelées à –70 °C avant d'être expédiées sur de la glace carbonique.

La réglementation appropriée de Transport Canada doit toujours être appliquée pour le transport sécuritaire de matières infectieuses et de marchandises dangereuses.

Pour obtenir des renseignements sur l'envoi de sérums, de prélèvements cliniques et d'isolats de virus de la rougeole, veuillez communiquer avec le LLCM.

Laboratoire des exanthèmes viraux
Centre scientifique canadien de santé humaine et animale
Laboratoire de lutte contre la maladie
1015 rue Arlington
Winnipeg (Manitoba) R3E 3R2

Chef : D^r^ Graham Tipples
Téléphone : 204-789-6080
Télécopieur : 204-789-5009
Courriel : graham_tipples@hc-sc.gc.ca

Appendix E

CURRENT RECOMMENDATIONS REGARDING COMMERCIAL MEASLES IgM SEROLOGY TEST KITS

The laboratory subcommittee of the WGMEC recently completed a study on the relative performance of indirect measles IgM enzyme immunoassays (EIAs) and IgM capture assays using a total of 308 serum samples from confirmed measles outbreak cases and 454 samples from non-measles cases[2]. This evaluation included the Behring, Clark, Gull, and PanBio EIAs and a commercial IgM capture assay (Light Diagnostics) along with the CDC measles IgM capture assay. Overall, the Gull and Behring EIAs (sensitivity: 88.3%, 88.6%; specificity: 99.6%, 96.7%; positive predictive value: 99.6%, 97.8%; negative predictive value: 93.0%, 94.6%, respectively) were found to be the best commercial kits for measles IgM serology. The CDC measles IgM capture assay was also found to be highly sensitive and specific. The CDC measles IgM capture procedure is available at the LCDC. Based on this data, the WGMEC currently recommends the use of either the Gull or Behring commercial EIAs for measles IgM serology.

The timing of the specimen collection was an important criterion for IgM seropositivity regardless of the test used, and the best seropositivity rates in the range of 92% to 100% were observed with samples collected 6 to 14 days after the onset of symptoms. Sera positive for other IgM markers such as rubella, parvovirus B19, EBV, and HHV-6, etc. gave false positive reactions in some of the assays including the capture assays.

Annexe E

RECOMMANDATION ACTUELLE CONCERNANT LES TROUSSES SÉROLOGIQUES COMMERCIALES POUR LES IgM DE LA ROUGEOLE

Le sous-comité des laboratoires du GTERC a récemment terminé une étude sur la performance relative des dosages immunoenzymatiques (EIA) indirects des IgM de la rougeole et des épreuves par immunocapture des IgM à l'aide de 308 échantillons de sérum provenant de cas confirmés de rougeole survenus lors d'éclosions et de 454 échantillons de cas qui n'étaient pas des cas de rougeole[2]. On a ainsi évalué, entre autres, les épreuves EIA des compagnies Behring, Clark, Gull et PanBio et une trousse commerciale d'immunocapture des IgM (Light Diagnostics) ainsi que l'épreuve d'immunocapture des IgM de la rougeole des CDC. Dans l'ensemble, ce sont les épreuves EIA de Gull et Behring (sensibilité : 88,3 %, 88,6 %; spécificité : 99,6 %, 96,7 %; valeur prédictive positive : 96,6 %, 97,8 %; valeur prédictive négative : 93.0 %, 94,6 %, respectivement) qui ont été jugées les meilleures trousses commerciales pour la sérologie des IgM de la rougeole. L'épreuve d'immunocapture des IgM de la rougeole des CDC est disponible aux LLCM. En se fondant sur ces données, le GTERC recommande actuellement qu'on utilise les trousses EIA commerciales de Gull ou de Behring pour la sérologie des IgM de la rougeole.

Le moment de l'obtention du prélèvement était un critère important de la séropositivité IgM, indépendamment de l'épreuve utilisée, et les meilleurs taux de séropositivité de l'ordre de 92 % à 100 % ont été observés pour les échantillons prélevés entre 6 et 14 jours après l'apparition des symptômes. Les sérums qui étaient positifs pour d'autres marqueurs IgM comme la rubéole, le parvovirus B19, le EBV, le HHV-6 etc. ont donné des résultats faussement positifs avec certaines épreuves, dont les épreuves d'immunocapture.

Table 1/Tableau 1
Relative sensitivity, specificity, and predictive value of measles IgM tests
Sensibilité, spécificité et valeur prédictive relatives des tests IgM de la rougeole

	Behring	Clark	Gull	PanBio	Light Diagnostics	CDC
Sensitivity[a] / Sensibilité[a]	88.6% (85.1-92.1)[b]	82.8% (76.6-87.0)	88.3% (84.7-91.9)	83.1% (78.9-87.3)	92.2% (89.2-95.2)	87.0% (82.3-91.7)
Specificity[c] / Spécificité[c]	96.7% (95.1-98.3)	97.1% (95.6-98.6)	99.6% (99.0-100)	86.6% (83.5-89.7)	86.6% (83.5-89.7)	94.8% (92.4-96.8)
Positive predictive value / Valeur prévisionnelle positive	97.8% (96.1-99.5)	95.9% (93.5-98.3)	99.6% (98.9-100)	97.7% (95.9-99.5)	88.2% (84.7-91.7)	96.1% (93.3-98.9)
Negative predictive value / Valeur prévisionnelle négative	94.6% (92.5-96.7)	90.2% (87.6-92.8)	93.0% (90.7-95.3)	91.4% (88.8-94.0)	95.9% (94.0-97.8)	95.7% (93.5-97.5)

(a) Based on a total of 308 samples tested except the CDC capture assay which was tested with 200 samples./Fondé sur un total de 308 échantillons testés, sauf l'épreuve d'immunocapture des CDC qui a été testé avec 200 échantillons.
(b) 95% confidence interval./Intervalle de confiance à 95 %.
(c) Based on a total of 454 samples tested except the CDC capture assay which was tested with 423 samples./Fondé sur un total de 454 échantillons testés, sauf l'épreuve d'immunocapture des CDC qui a été testé avec 423 échantillons.

References

1. Kobune F, Sakata H, Sugiura A. *Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus*. J Virol 1990;64:700-05.
2. Ratnam S, Tipples G, Head C et al. *Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology tests and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles*. J Clin Microbiol. In press.

Références

1. Kobune F, Sakata H, Sugiura A. *Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus*. J Virol 1990;64:700-05.
2. Ratnam S, Tipples G, Head C et coll. *Performance of indirect immunoglobulin M (IgM) serology tests and IgM capture assays for laboratory diagnosis of measles*. J Clin Microbiol (Sous presse).

Our mission is to help the people of Canada maintain and improve their health.

Health Canada

The Canada Communicable Disease Report (CCDR) presents current information on infectious and other diseases for surveillance purposes and is available through subscription. Many of the articles contain preliminary information and further confirmation may be obtained from the sources quoted. Health Canada does not assume responsibility for accuracy or authenticity. Contributions are welcome (in the official language of your choice) from anyone working in the health field and will not preclude publication elsewhere.

Scientific Advisors	Dr. John Spika	(613) 957-4243
	Dr. Fraser Ashton	(613) 957-1329
Editor-in-Chief	Eleanor Paulson	(613) 957-1788
Assistant Editor	Nicole Beaudoin	(613) 957-0841
Desktop Publishing	Francine Boucher	

Submissions to the CCDR should be sent to the Editor-in-Chief, Laboratory Centre for Disease Control, Tunney's Pasture, Address Locator 0602C2, Ottawa, Ontario K1A 0L2.

To subscribe to this publication, please contact:

Canadian Medical Association	Tel. No.:	(613) 731-8610 Ext. 2307
Member Service Centre		or (888) 855-2555
1867Alta Vista Drive	FAX:	(613) 236-8864
Ottawa, ON Canada K1G 3Y6		

Annual subscription: $83.00 (plus applicable taxes) in Canada; $109 (U.S.) outside Canada.

© Minister of Health 1999 (On-line) ISSN 1481-8531
Publications Mail Agreement No. 1437887

This publication can also be accessed electronically via Internet using a Web browser at <http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc>. It can also be accessed at any time from any fax machine using LCDC's FAX*link* Service by calling 1-613-941-3900.

Notre mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

Pour recevoir le Relevé des maladies transmissibles au Canada (RMTC), qui présente des données pertinentes sur les maladies infectieuses et les autres maladies dans le but de faciliter leur surveillance, il suffit de s'y abonner. Un grand nombre des articles qui y sont publiés ne contiennent que des données sommaires, mais des renseignements complémentaires peuvent être obtenus auprès des sources mentionnées. Santé Canada ne peut être tenu responsable de l'exactitude, ni de l'authenticité des articles. Toute personne travaillant dans le domaine de la santé est invitée à collaborer (dans la langue officielle de son choix); la publication d'un article dans le RMTC n'en empêche pas la publication ailleurs.

Conseillers scientifiques :	D^r^ John Spika	(613) 957-4243
	D^r^ Fraser Ashton	(613) 957-1329
Rédactrice en chef :	Eleanor Paulson	(613) 957-1788
Rédactrice adjointe :	Nicole Beaudoin	(613) 957-0841
Éditique :	Francine Boucher	

Pour soumettre un article, veuillez vous adresser à la Rédactrice en chef, Laboratoire de lutte contre la maladie, pré Tunney, Indice à l'adresse : 0602C2, Ottawa (Ontario) K1A 0L2.

Pour vous abonner à cette publication, veuillez contacter :

Association médicale canadienne	N° de téléphone :	(613) 731-8610 Poste 2307
Centre des services aux membres		ou (888) 855-2555
1867 promenade Alta Vista	FAX :	(613) 236-8864
Ottawa (Ontario), Canada K1G 3Y6		

Abonnement annuel : 83 $ (et frais connexes) au Canada; 109 $ US à l'étranger.

© Ministre de la Santé 1999 (En direct) ISSN 1481-8531
Poste-publications n° de la convention 1437887

On peut aussi avoir accès électroniquement à cette publication par Internet en utilisant un explorateur Web, à <http://www.hc-sc.gc.ca/hpb/lcdc>. On peut y accéder également d'un télécopieur, à toute heure, en utilisant le service FAX*link* du LLCM en composant le 1-613-941-3900.